PRAWARUN AGRICULTURAL JOURNAL

https://li01.tci-thaijo.org/index.php/pajrmu/index

บทความวิจัย

การวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่างจากของเหลวในกระเพาะหมักของโคนมเจาะกระเพาะ ด้วยวิธีเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปี

ธีระกุล นิลนนท์[1*] ฤทธิชัย พิลาไชย[1] กษมา ชารีโคตร[2] และ ศรัญญา วอขวา[2]

[1]สาขาวิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี 41000

[2]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี 41000

ข้อมูลบทความ

Article history

รับ: 21 พฤษภาคม 2564

แก้ไข: 27 พฤษภาคม 2564

ตอบรับการตีพิมพ์: 30 พฤษภาคม 2564

ตีพิมพ์ออนไลน์: 28 มิถุนายน 2564

คำสำคัญ

กรดไขมันระเหยได้

ค่าความเป็นกรดด่าง

เนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปี

บทคัดย่อ

การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid; VFA) ในของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการที่ใช้วินิจฉัยภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักในโคนม การศึกษาที่ผ่านมาบ่งชี้ว่าการตรวจระดับ VFA จากตัวอย่างต่างๆ โดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปี (Near-infrared spectroscopy; NIRS) ให้ผลการศึกษาน่าเชื่อถือนำไปใช้เพื่อการวิเคราะห์ได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ VFA ทั้งหมด (Total VFA) และ pH จากของเหลวในกระเพาะหมักจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ กับความเข้มข้นของ VFA และ pH จากการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักโคนมพันธุ์ผสมโฮลสไตน์ฟรีเชียนเปิดผ่ากระเพาะหมักและเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระเพาะหมักเป็นกรด จำนวน 128 ตัวอย่าง โดยเก็บทุกๆ 2 ชั่วโมงหลังให้อาหารข้น จำนวน 7 ครั้ง/วัน ตลอดระยะเวลาการศึกษา 16 วัน ตรวจทางห้องปฏิบัติการหาความเข้มข้น Total VFA และค่า pH โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) และ pH meter แบบภาคสนาม ตามลำดับ และวัดค่าด้วยเทคนิค NIRS เพื่อสร้างสมการทำนายค่า ผลการศึกษาพบว่า ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ Total VFA และค่า pH การตรวจทางห้องปฏิบัติการ เท่ากับ 105.82 mM/L (105.82±39.74) และ 5.4±0.44 ตามลำดับ การวิเคราะห์ทางสถิติทำนายความเข้มข้นของ VFA และค่า pH ด้วยเทคนิค NIRS มีค่าสหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.93 และ 0.85 ตามลำดับ การประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS วิเคราะห์ความเข้มข้นของ Total VFA และค่า pH จากตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก ถือว่าเป็นเทคนิคที่มีความน่าเชื่อถือระดับปานกลางในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านการวิจัย ซึ่งจำเป็นต้องมีการเก็บข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

บทนำ

โคนมที่ให้ผลผลิตสูงมักจะเกิดโรคหรือความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม (metabolic disorder) ที่ส่งผลกระทบต่อการให้ผลผลิต เช่น โรคไข้น้ำนม (milk fever) โรคคีโตซีส (ketosis) ภาวะกระเพาะแท้เคลื่อนผิดตำแหน่ง (displace abomasum) ภาวะไขมันแทรกในตับ (fatty liver) และภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก (rumen acidosis) ซึ่งสาเหตุหลักๆ เกิดจากระดับการให้ผลผลิตและการให้อาหารไม่สอดคล้องกันและไม่เหมาะสม (Mulligan & Doherty, 2008) ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบกึ่งเฉียบพลัน (SARA) เป็นหนึ่งในโรคหรือความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่พบได้บ่อยและก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในการเลี้ยงโคนม ส่วนมากถูกตรวจพบในโคนม

* Corresponding author

E-mail address: theerakul_nil@yahoo.com (T. Nilnont)

Online print: 28 June 2021. Copyright © 2021. This is an open access article, production and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. https://doi.org/10.14456/paj.2021.8

หลังคลอดที่อยู่ในช่วงต้นของระยะการให้นม (early lactation) เนื่องจากเป็นระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงการให้อาหารจากระยะพักรีดนม (อาหารพลังงานต่ำ) มาเป็นอาหารระยะคลอดหรือให้นม (อาหารพลังงานสูง) และโคมีการกินอาหารมากขึ้นเพื่อให้พอเพียงกับความต้องการในการให้ผลผลิตน้ำนม ส่งผลให้กระเพาะหมักปรับตัวไม่ทันและเกิดการสะสมกรดตามมา (Plaizier et al., 2008) ในประเทศไทยมีรายงานความชุกของภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบกึ่งเฉียบพลันในโคนมหลังคลอด 30 และ 50 วัน ร้อยละ 42.6 และ 42.0 ตามลำดับ ในพื้นที่ฟาร์มโคนมอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น (Jarassaeng et al., 2006) และพบความชุกในโคนมหลังคลอดระหว่าง 3 ถึง 6 สัปดาห์ ร้อยละ 20 ถึง 25 ในพื้นที่ฟาร์มโคนมจังหวัดนครปฐม (Inchaisri et al., 2013, Inchaisri et al., 2014)

ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก เกิดจากการสะสมของกรดอินทรีย์ (organic acid) เช่น กรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid; VFA) ได้แก่ กรดอะซิติค (acetic acid; C2) กรดโพรพิออนิก (propionic acid; C3) และ กรดบิวทิริก (butyric acid; C4) โดยมีสัดส่วนการสร้างประมาณร้อยละ 70:20:10 ตามลำดับ ซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงไปตามลักษณะของอาหารที่ให้ (Seymour et al., 2005) และกรดแลคติค (lactic acid) ที่เกิดจากการย่อยคาร์โบไฮเดรตโดยจุลชีพในกระเพาะหมัก โดยการสะสมของกรดเกิดจากความไม่สมดุลระหว่างการสร้างกรดจากกระบวนการหมักที่มากเกินไป และการกำจัดกรดโดยการนำไปใช้ของจุลชีพและการดูดซึมกรดจากกระเพาะหมักที่ลดลง (Nagaraja and Titgemeyer, 2007) โดยการสร้างกรดที่มากขึ้นเกิดจากการกินแหล่งวัตถุดิบคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย เช่น แป้ง ธัญพืช ในปริมาณมาก ส่งผลให้จุลชีพที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนขึ้น เช่น แบคทีเรียกลุ่ม amylolytic amylodextrin และ maltose - utilizing (Kotarski et al., 1992) ร่วมกับการได้รับอาหารหยาบ (roughage) หรือปริมาณเยื่อใยในอาหารไม่เพียงพอ ซึ่งส่งผลต่อการเคี้ยวเอื้อง (mastication) และปริมาณการหลั่งน้ำลายซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ (ไบคาร์บอเนต; -HCO_3) ที่สำคัญของการลดความเป็นกรดในกระเพาะหมัก (Owens et al., 1998) ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic producing bacteria) เช่น *Streptococcus bovis* ทำให้มีการสะสมของกรดเพิ่มขึ้น (Nagaraja & Titgemeyer, 2007) ส่งผลให้เกิดภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก ทั้งแบบเฉียบพลัน (acute rumen acidosis) และแบบกึ่งเฉียบพลัน (sub-acute rumen acidosis; SARA) (Gäbel et al., 2002; Kleen et al., 2003; , Plaizier et al., 2008) กระเพาะหมักลดการบีบตัว และกรดแลคติคจะถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดเกิดภาวะร่างกายเป็นกรด (metabolic acidosis) (Nocek, 1997)

การตรวจวินิจฉัยอาการทางคลินิกของภาวะกรดในกระเพาะหมัก (rumen acidosis) มีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยโดยการประเมินอาการผิดปกติ (clinical sign) ของโครายตัวหรือระดับฟาร์ม และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของของเหลวในกระเพาะหมัก (rumen fluid) และการวัดระดับความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ (Danscher et al., 2015, Stefanska et al., 2017, Mizuguchi et al., 2020) ซึ่งวิธีการนี้จำเป็นต้องทำการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมักโคเพื่อการตรวจวินิจฉัย โดยการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก สามารถทำได้ 2 วิธี คือ การเจาะและดูดเก็บผ่านผนังช่องท้อง (rumenocentesis) การผ่าตัดสร้างรูเปิดกระเพาะหมักถาวร (ruminal fistula) ซึ่งมักพบในการศึกษาวิจัย และการดูดเก็บผ่านท่อสอดหลอดอาหาร (stomach tube) โดยเทคนิคการดูดเก็บของเหลวในกระเพาะหมักผ่านผนังช่องท้อง (rumenocentesis) เป็นวิธีการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมักในส่วนล่าง (ventral sac) มีข้อดี คือ สามารถลดการปนเปื้อนของน้ำลายทำให้ได้ค่า pH ที่แม่นยำ ส่วนการเก็บตัวอย่างโดยใช้ท่อสอดกระเพาะอาหาร (stomach tube) เป็นวิธีการที่สะดวกและง่าย แต่เนื่องจากวิธีการนี้เป็นการสอดท่อผ่านช่องปากหลอดอาหาร ดังนั้นของเหลวที่ดูดเก็บได้มีการปนเปื้อนกับน้ำลายซึ่งมีค่า pH สูง ทำให้ค่า pH ที่วัดได้จากตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักที่เก็บด้วยวิธีนี้มีค่าคลาดเคลื่อนที่สูงขึ้นได้ (Duffield et al., 2004) และมีการศึกษาการตรวจระดับกรดไขมันที่ระเหยได้จากตัวอย่างต่างๆ ซึ่งให้ผลการศึกษาที่น่าเชื่อถือได้ในการนำไปใช้ประโยชน์ (Jacobi et al., 2009, Ward et al., 2011, Lean et al., 2013, Stockl and Lichti, 2018, Lee et al., 2019)

มีการศึกษาการใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟาเรดย่านใกล้ (Near-infrared spectroscopy; NIRS) วิเคราะห์องค์ประกอบของพืชอาหารสัตว์และองค์ประกอบด้านโภชนะของพืชอาหารสัตว์ เช่น ระดับโปรตีน เยื่อใย ระดับไขมัน ระดับพลังงานในวัตถุดิบอาหารสัตว์ รวมทั้งค่า pH ในอาหารหมัก ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือ (Corson et al., 1999) ใช้ตรวจหาโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการจากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนม (De Roos et al., 2007) ใช้ตรวจวิเคราะห์ระดับสารคีโตนในเลือดเปรียบเทียบกับสัดส่วนไขมันต่อโปรตีนในน้ำนมเพื่อสร้างสมการทำนายระดับของสารคีโตนในแม่โครีดนมหลังคลอด (Van Knegsel et al., 2010) ข้อดีของการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เทคนิค NIRS คือ ง่ายต่อการเตรียมตัวอย่าง

มีความรวดเร็วในการวัดค่า ได้ผลที่แม่นยำและถูกต้อง การตรวจสอบเป็นแบบไม่ทำลายตัวอย่าง ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะและสะดวกต่อการใช้งาน (Stermer et al., 1994)

ดังนั้น การตรวจคัดกรองภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักในโคนมโดยการใช้เทคนิคหรือเครื่องมือที่มีความแม่นยำและรวดเร็วในการตรวจ เช่นการใช้เทคนิคเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปี (Near-infrared spectroscopy; NIRS) ตรวจหาระดับความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้และค่า pH จากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก เป็นแนวทางที่น่าสนใจในการช่วยตรวจคัดกรองภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักและโรคทางเมแทบอลิก (metabolic disease) ในโคนม การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปีในการตรวจวัดค่าความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการกับค่าความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการสร้างสมการทำนายจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปี และเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์และคัดกรองภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักและโรคทางเมแทบอลิกในฟาร์มต่อไป

วัสดุ/วิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

โคนมเพศผู้พันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียนลูกผสม มีน้ำหนักตัว (body weight) ประมาณ 250 กิโลกรัม อายุประมาณ 14 เดือน สุขภาพแข็งแรง ทำการผ่าตัดเพื่อเปิดกระเพาะหมักแบบถาวร (permanent rumen fistulation) บริเวณสวาปด้านซ้าย เพื่อทำการเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) ซึ่งในช่วงดำเนินการทดลองโคจะถูกเลี้ยงในโรงเรือนเปิด ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาท้องถิ่นบ้านตาด มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี โดยเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิสิ่งแวดล้อม โดยแยกเลี้ยงในคอกทดลองเดี่ยวพื้นคอนกรีตและดิน มีพื้นที่ขนาด 3×5 ตารางเมตร มีรางอาหารและบ่อน้ำดื่มแยกในคอกเลี้ยง

การศึกษาวิจัยนี้ ได้รับพิจารณาเห็นชอบจากคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี หมายเลขโครงการที่ได้รับการพิจารณา ศธ 0543.7/358 โดยปฏิบัติตามหลักจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสภาวิจัยแห่งชาติ ประเทศไทย

อาหารที่ใช้ทดลองเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบกึ่งเฉียบพลัน (subacute ruminal acidosis; SARA)

ระยะก่อนการทดลอง (pre-experimental period) (17 วัน) เป็นระยะเวลาที่ให้โคนมปรับตัวต่อคอกทดลองและการให้อาหาร ในระยะนี้มีการเตรียมตัวโคก่อนเข้าสู่ระยะทดลอง ดังนี้ โคนมในระยะก่อนการทดลองได้รับการให้อาหารแบบแยกให้อาหารข้นกับอาหารหยาบ (separate feeding) โดยในระยะนี้โคทดลองได้รับอาหารข้น (concentrate) ซึ่งเป็นอาหารข้นที่ประกอบขึ้นในฟาร์ม ปริมาณ 1.1 กิโลกรัมของวัตถุแห้ง (dry matter) ต่อตัวต่อครั้ง แบ่งจ่ายให้ 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) รวมเป็นปริมาณ 2.2 กิโลกรัมของวัตถุแห้ง ต่อตัวต่อวัน โดยมีส่วนประกอบวัตถุดิบและองค์ประกอบทางเคมีแสดงดัง Table 1 และ Table 2 โคทดลองได้รับอาหารหยาบเป็นฟางข้าวแบบไม่จำกัด (ad libitum) ร่วมกับมีน้ำดื่มให้ตลอดเวลา

ระยะการทดลอง (experimental period) (16 วัน) เป็นระยะเวลาที่ทำการทดลองและเก็บตัวอย่างจากโคทดลอง ซึ่งโคทดลองถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบกึ่งเฉียบพลัน โดยวิธีการให้อาหารข้นแยกกับอาหารหยาบ ที่มีสัดส่วนของอาหารข้นที่สูงร่วมกับการจำกัดปริมาณอาหารหยาบ (สัดส่วนอาหารหยาบต่ออาหารข้น 20:80) ซึ่งโคได้รับอาหารข้นที่ประกอบขึ้นจากการคำนวณโดยใช้องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุที่รายงานโดย National Research Council (NRC) (2001) ปริมาณ 4 กิโลกรัมของวัตถุแห้ง ต่อตัวต่อครั้ง แบ่งจ่ายให้ 2 ครั้ง (เช้า 6.00 นาฬิกา และตอนเย็น 16.00 นาฬิกา) รวมปริมาณ 8 กิโลกรัมของวัตถุแห้งต่อตัวต่อวัน และใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งอาหารหยาบ ปริมาณ 2 กิโลกรัมของวัตถุแห้งต่อตัวต่อวัน โดยโคได้รับแหล่งอาหารหยาบหลังจากกินอาหารข้นประมาณ 30 นาที (Pilachai et al., 2012) ส่วนประกอบวัตถุดิบและองค์ประกอบทางเคมี แสดงใน Table 1

การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักโคทดลอง

ในช่วงระยะการทดลอง ทำการเก็บของเหลวจากกระเพาะหมักของโคทดลองทุกวัน ด้วยความถี่จำนวน 8 ครั้งต่อวัน ตลอดระยะเวลา 16 วัน ของช่วงระยะการทดลอง โดยเก็บตัวอย่างก่อนการให้อาหารข้นโคช่วงเช้า (ชั่วโมงที่ 0) และหลังจากให้อาหารข้นช่วงเช้า ชั่วโมงที่ 2 4 6 8 10 12 และ 14 ตามลำดับหลังกินอาหารข้น วิธีการเก็บตัวอย่างทำตามวิธีของ Wang et al. (2016) โดยการบังคับโคในซองบังคับสัตว์ ทำการเปิดฝา

Table 1 Ingredient composition (%dry matter; %DM) and chemical composition of the dietary feed ingredient.

Ingredient/Chemical composition	%DM
Cassava ship	46.3*
Soybean meal	35.2*
Rice bran	17.1*
Premix[1]	1.4*
Dry matter	89.37**
TDN	81.24**
ME (Mcal/kgDM)	2.94**
Crude protein (CP)	20.39**
Fat	5.20**
NDF	11.92**
ADF	9.56**

*The ratios of feed ingredient (Pilachai et al., 2012),

**Calculated using measured DMI, composition and feed analyses (NRC, 2001);

TDN = Total Digestible Nutrients, ME = Metabolizable Energy,

NDF = Neutral Detergent Fiber,

ADF = Acidic Detergent Fiber

rumen fistular ใช้อุปกรณ์ท่อ สายยาง และไซริงค์ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ดูดของเหลวจากกระเพาะหมักบริเวณกระพุ้งด้านล่าง (ventral sac) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นเทตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักใส่ถ้วยพลาสติก และทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างทันที โดยตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักแต่ละตัวอย่างจะทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยเครื่องมือวัดค่าความเป็นกรด-ด่างแบบพกพาที่ใช้อิเล็กโทรดเปียก (portable pH meter SevenGo FK2, Mettler Toledo, Switzerland) ซึ่งก่อนการวัดในแต่ละครั้งจะทำการ calibrate 2 ระดับ ด้วยน้ำยามาตรฐานที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 และ 4 โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่กำหนดเป็นค่าขีดเริ่มเปลี่ยน (threshold value) ของภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบกึ่งเฉียบพลัน กำหนดไว้ที่ pH น้อยกว่า 5.5 (Plaizier, 2008, Danscher et al., 2015, Stefanska et al., 2017) หลังจากทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเหลวจากกระเพาะหมักถูกกรองผ่านผ้าก๊อซจำนวน 4 ชั้น จากนั้นนำของเหลวจากกระเพาะหมักที่ผ่านการกรองปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาเติมด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 โมล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ทางห้องปฏิบัติการ ส่วนของเหลวจากกระเพาะหมักที่ผ่านการกรองส่วนที่เหลือ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ใช้เวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนและเก็บของเหลวส่วนที่ใสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสโดยไม่เติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เพื่อการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปี

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักที่เติมกรดซัลฟิวริกและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ถูกทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้องและปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ของเหลวส่วนใส (supernatant) ถูกดูดและกรองผ่าน disposable filter ที่มีขนาด 0.45 และ 0.22 ไมครอน ตามลำดับ นำของเหลวที่ผ่านการกรองแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเก็บในหลอดเก็บตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile fatty acids; Total VFA) ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี-แมสสเปคโทรมิเตอร์ (Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC-MS) (Variance CP-3800, USA) (Mathew et al.,1997, Hall et al., 2014, Xue et al.,2018)โดยมีคุณลักษณะของการวิเคราะห์ (analytical condition) ดังนี้ ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักที่ใสจะถูกเติมสารละลายมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยได้ (Fatty Acid Methyl Ester; FAMEs) ปริมาตร 10 µl จากนั้นทำการฉีดตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง GC ที่บริเวณฉีดสาร (injector port) ที่อุณหภูมิ 50 °C สู่คอลัมน์ขนาดเล็ก (capillary column) ซึ่งเป็นเฟสคงที่ (stationary phase) ที่เคลือบด้วย 5% diphenyl cross-linked 95% dimethylpolysiloxane มีความยาว 300 mm. มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 250 µm และมีความหนาของแผ่นเคลือบเท่ากับ 0.25 µm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) โดยใช้แก๊สฮีเลียม (Helium; He) เป็นแก๊สตัวพาสาร (carrier gas) เพื่อการแยกองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยมีอัตราการไหลของสารภายในคอลัมน์สูงสุด เท่ากับ 3 มิลลิลิตรต่อนาที และมีอัตราการไหลของแก๊สตัวพาผ่านคอลัมน์ เท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาณของสารที่ตรวจวัดในตัวอย่างถูกวัดด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ชนิดมวล (Mass Spectrometry; MS) โดยมีหลักการคือสารที่ออกมาจากคอลัมน์ขนาดเล็ก (capillary column) ซึ่งเป็นเฟสคงที่ (stationary phase) จะถูกทำให้แตกตัวเป็นไอออนด้วยอิเล็คตรอน (electron impact mode) จากนั้น ไอออนของสารจะถูกตรวจจับด้วยส่วนตรวจจับไอออน (ion detector) และแสดงผลเป็นสเปกตรัม (spectrum) ของการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารที่ตรวจวัดได้คำนวณจากการใช้พื้นที่ใต้กราฟคำนวณกับสมการของกราฟสารมาตรฐาน (standard reagent, Sigma-Aldrich, USA)

การวิเคราะห์ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักด้วยเทคนิคเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปี

นำตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักที่ไม่ได้เติมกรดซัลฟิวริก มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปี เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของสเปกตรัมและค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่ากรดไขมันที่ระเหยได้ โดยทำการตรวจวิเคราะห์ ณ คณะวิศวกรรมศาสตร์และสถาปัตยกรรมศาสตร์ สาขาวิศวกรรมหลังการเก็บเกี่ยวและแปรสภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตขอนแก่น โดยวิเคราะห์ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักที่ผ่านการกรองและไม่เติมกรดซัลฟิวริกเพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนการวิเคราะห์จากโมเลกุลของกรดที่เติม วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่องเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปี ได้แก่ เครื่อง Fourier transform near infrared spectroscopy (FT-NIR) มีคุณสมบัติวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1,000-2,500 nm โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงแต่ละตัวอย่างจะทำการปิดด้วยวัสดุกันสะท้อน (path length) และวัดค่าการดูดกลืนแสงซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อหาองค์ประกอบในตัวอย่างและทำสมการทำนายความเข้มข้นของค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่ากรดไขมันที่ระเหยได้

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

กำหนดให้ตัวแปรอิสระ (independence variable) และตัวแปรตาม (dependence variable) คือผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงจากตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักด้วยเครื่องเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปีแต่ละเครื่องและผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการตรวจหาค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่ากรดไขมันที่ระเหยได้ตามลำดับ นำข้อมูลสเปคตรัมจากการวิเคราะห์ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก มาสร้างสมการทำนายค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่ากรดไขมันที่ระเหยได้ จากสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ด้วยวิธีการวิเคราะห์การถดถอยกำลังน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares regression; PLSR) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสเปคตรัมการดูดกลืนแสง (ตัวแปรอิสระ) กับค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่ากรดไขมันที่ระเหยได้ที่วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (ตัวแปรตาม) โดยใช้ค่า Root Mean Square Error of Cross Validation (RMSECV) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient; R) ระหว่างค่าที่ได้จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ กับค่าที่ได้จากการทำนายด้วยเครื่องเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปี เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกสมการ (William, 2007; Sukhontarad and Yawongsa, 2020) ทำการปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัมเพื่อลดความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Unscramble version 9.7

ผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักจากโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียนลูกผสมที่เปิดผ่ากระเพาะหมัก และตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยใช้เครื่อง GC-MS ผลการศึกษาพบว่าภาพรวมของการเก็บตัวอย่างหลังจากกินอาหารข้น (ชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14) ตลอดระยะการศึกษา 16 วัน มีค่าเฉลี่ยกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total VFA) ของตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก เท่ากับ 105.82 mM/L (105.82 ± 39.74) มีค่าต่ำสุด เท่ากับ 46.68 mM/L และมีค่าสูงสุด เท่ากับ 255.03 mM/L (Figure 1 A) ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก มีค่าเท่ากับ 5.4 ± 0.44 โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุด เท่ากับ 4.77 และมีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงที่สุด เท่ากับ 6.83 (Figure 1 B) เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย pH ของตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมักและค่าเฉลี่ย Total VFA จากของเหลวในกระเพาะหมักในระยะเวลา 16 วันของการศึกษา พบว่า วันที่ที่มีค่าเฉลี่ย pH ของตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5.5 (pH≤5.5) คือวันที่ วันที่ 7 8 12 13 (ชั่วโมงที่ 0-8 หลังกินอาหารข้น) วันที่ 15 (ชั่วโมงที่ 0-6 หลังกินอาหารข้น) และวันที่ 16 ซึ่งค่าเฉลี่ย Total VFA มีแนวโน้มสูงขึ้นในวันที่ 7, 9, 13 และ 16 (Figure 2) ผลการวิเคราะห์การถดถอยกำลังน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares regression; PLSR) เพื่อสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่า pH ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปี และค่าความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก จากการวิเคราะห์ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักตัวอย่างจำนวน 128 ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง FT-NIR โดยมีความยาวคลื่น 1,000-2,500 และ 901.54-1,101.37 ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์การดูดกลืนแสงในตัวอย่างตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักแต่ละตัวอย่าง จำนวน 2 ครั้ง (2 ซ้ำ) ได้ข้อมูลค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงจากเครื่องเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปีแต่ละเครื่อง จำนวน 256 ตัวอย่าง การสร้างกราฟสอบเทียบความถูกต้องของสมการ (calibration curve) ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแกน Y ที่กำหนดให้ตัวแปรอิสระ (independence variable) คือโดยผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่างตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักด้วยเครื่องเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปีแต่ละเครื่อง และแกน X

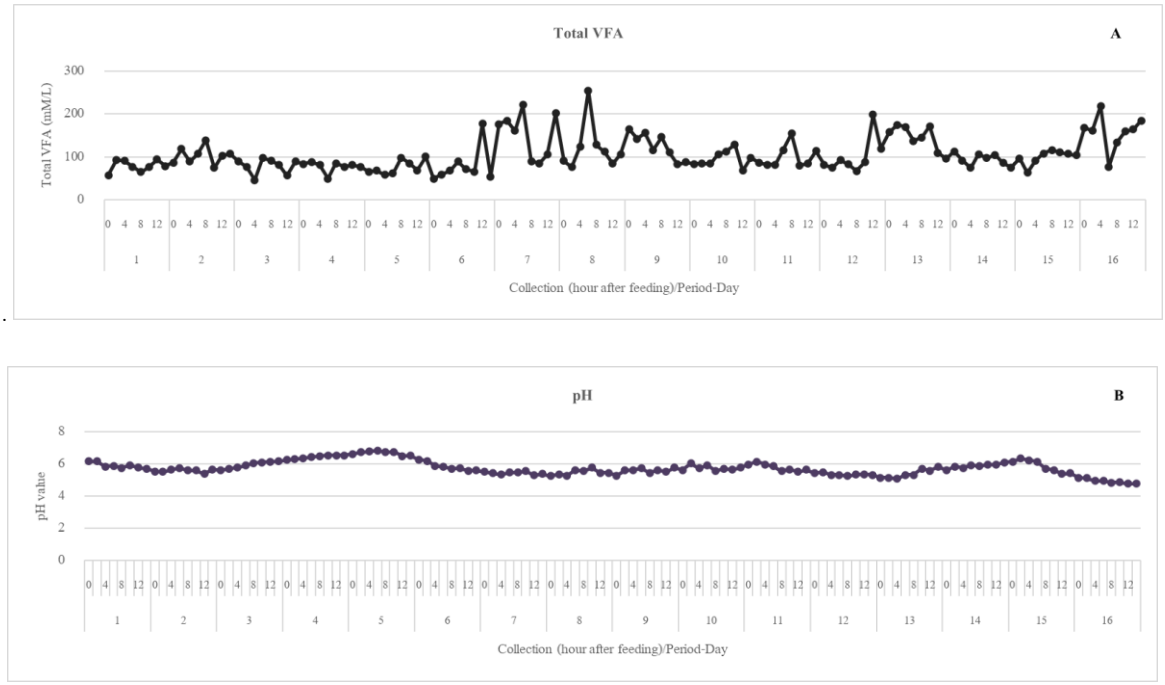
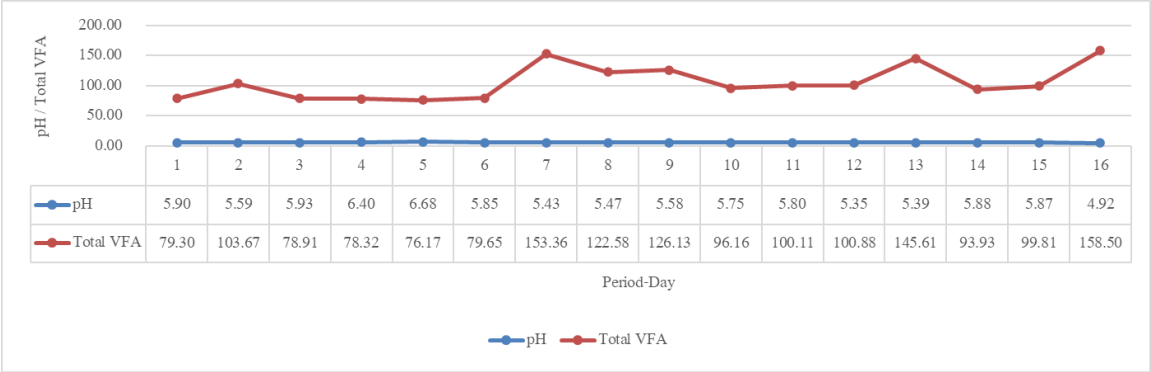


Figure 1 The overall distribution of rumen fluid Total VFA (A) and rumen fluid pH (B) of 128 Holstein Friesian dairy cow rumen fluid samples taken by 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 hrs. after fed for 16 days period.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
pH	5.90	5.59	5.93	6.40	6.68	5.85	5.43	5.47	5.58	5.75	5.80	5.35	5.39	5.88	5.87	4.92
Total VFA	79.30	103.67	78.91	78.32	76.17	79.65	153.36	122.58	126.13	96.16	100.11	100.88	145.61	93.93	99.81	158.50

Figure 2 The comparison of rumen fluid pH values (mean) and Total VFA (mean) in 16 days period of the study.

ที่กำหนดให้เป็นตัวแปรตาม (dependence variable) คือผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการตรวจหาค่าความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก โดยพบว่า วิธีการวิเคราะห์ PLSR ให้กราฟของสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FT-NIR กับค่าความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total VFA) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก ที่เหมาะสมที่สุด ดังแสดงใน Figure 3 และ Figure 4 ตามลำดับจากนั้นนำข้อมูลตัวแปรอิสระและตัวแปรตามมาวิเคราะห์การถดถอยกำลังน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares regression; PLSR) เพื่อสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่างในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักโดยพิจารณาความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี จากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R) และค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างสมการ (root mean standard error of calibration; RMSECV) ผลการศึกษานี้พบว่า สเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี 2nd Derivative มีความเหมาะสมสำหรับการทำนายความเข้มข้นกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยสมการที่ใช้ทำนายความเข้มข้นกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในของเหลวจากกระเพาะหมัก ที่วิเคราะห์จากเครื่อง FT-NIR มีค่า R เท่ากับ 0.93 และ 0.85 ตามลำดับ และมีค่า RMSECV เท่ากับ 0.43 และ 0.35, ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 The statistical analysis of rumen fluid Total VFA and pH values using FT-NIR analyzed by partial least squares

Spectrum modulation	Total VFA		pH values	
	R	RMSECV	R	RMSECV
None	0.89	0.73	0.76	0.43
Smoothing method	0.81	2.04	0.72	0.43
1st derivative method	0.87	0.38	0.88	0.11
2nd derivative method	**0.93**	**0.43**	**0.85**	**0.35**
SNV method	0.88	1.01	0.88	0.03
MSC method	0.89	1.05	0.85	0.34

regression (PLSR)

สรุป และอภิปรายผล

ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบกึ่งเฉียบพลันเกิดจากการสะสมของกรดไขมันระเหยได้ซึ่งส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะหมักลดลง (Owens et al., 1998) วิธีการบ่งชี้ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบกึ่งเฉียบพลันที่ถูกยอมรับ คือการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก (ruminal fluid) ซึ่งมีวิธีการเก็บตัวอย่างและการกำหนดค่าขีดเริ่มเปลี่ยน (threshold value) ของค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการกำหนดภาวะเป็นกรดแบบกึ่งเฉียบพลันที่แตกต่างกัน เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่างของของเหลวในกระเพาะหมักที่เก็บโดยการเจาะกระเพาะหมักผ่านทางผนังช่องท้องบริเวณสวาป (rumenocentesis) ที่ระดับ pH 5.5 (Krause and Oetzel, 2006, Stefanska et al., 2016) กำหนดที่ระดับ pH 5.8 ในวิธีการเก็บจากถุงส่วนล่าง (ventral sac) ของกระเพาะหมักโดยตรง (Beauchemin et al., 2003; Krause and Oetzel, 2006) ส่วน Fleming et al. (2020) กล่าวว่า ค่า pH ที่บ่งชี้ภาวะ SARA ในโคนม คือน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5.5 (pH≤5.5) เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง (240 นาที) (Fleming et al., 2020) โดยในการศึกษานี้ พบว่า ค่า pH ในของเหลวจากกระเพาะหมัก ที่มีค่า ≤5.5 พบในระยะการศึกษาวันที่ 7 8 12 และ 13 (ชั่วโมงที่ 0-8 หลังกินอาหารข้น) วันที่ 15 (ชั่วโมงที่ 0-6 หลังกินอาหารข้น) และวันที่ 16 ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของ total VFA ที่เพิ่มขึ้นในช่วงวันเดียวกัน โดยค่า Total VFA มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในวันที่ 6-7, 12-13 และวันที่ 16 ของระยะเวลาศึกษา ซึ่งรูปแบบของการเพิ่มขึ้นของ VFA ใกล้เคียงและสอดคล้องกับการศึกษาของ Fleming et al. (2020) ซึ่งมีค่ากรดไขมันระเหยได้ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นในวันที่

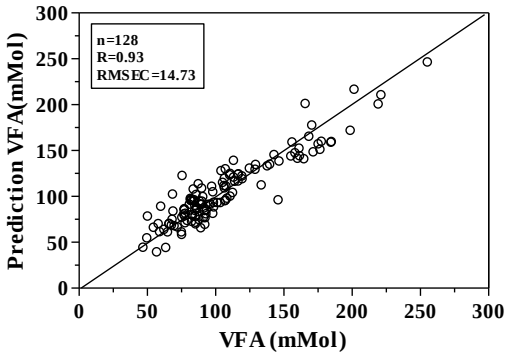


Figure 3 The calibration curve of rumen fluid Total VFA analyzed by partial least squares regression (PLSR)

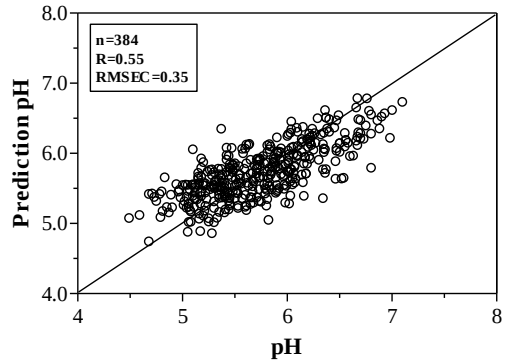


Figure 4 The calibration curve of rumen fluid pH values analyzed by partial least squares regression (PLSR)

11-12 และ16-18 ของระยะการศึกษา 20 วัน (Fleming et al., 2020)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ของการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก โดยเป็นการสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้และค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเทคนิค NIRS หาความสัมพันธ์กับวิธีการตรวจมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งผลการสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก พบว่าสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่ง (modulation) โดยการลดความแปรปรวนของข้อมูลสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยการสร้างสมการแบบ PLSR โดยวิธี 2nd Derivative เป็นวิธีที่มีความเหมาะสมสำหรับการทำนายความเข้มข้นกรดไขมันที่ระเหยได้และค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งวิธีการปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัม มีข้อดีคือสามารถนำค่าองค์ประกอบทางเคมีมาคิดรวมกับข้อมูลสเปกตรัมการดูดกลืนแสง และสามารถประเมินค่าทางเคมี ทำให้สามารถอธิบายความแปรปรวนของข้อมูลประเมินค่าทางเคมีได้ในเวลาเดียวกัน ส่งผลให้สมการทำนายค่า (Calibration) ที่ได้

จากวิธี PLSR ประเมินค่าทางเคมีได้ถูกต้องมากขึ้น เนื่องจากสมการที่ใช้ทำนายความเข้มข้นกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS โดยใช้เครื่อง FT-NIR มีค่าสหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.93 และ 0.85 ตามลำดับ และมีค่า RMSECV เท่ากับ 0. 43 และ 0.35 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าสหสัมพันธ์ (R) ซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ในการทำนายความสัมพันธ์ของสมการที่สร้างขึ้นจากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค NIRS กับวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการมาตรฐาน พบว่า ค่า R ของความเข้มข้นกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักที่วิเคราะห์จากเครื่อง FT-NIR สามารถนำไปใช้เพื่อการตรวจคัดกรอง (screening) ใช้สร้างสมการทำนาย (calibration) และใช้เพื่อสร้างสมการทำนายในการศึกษาวิจัยได้ โดยค่า R ที่มีค่าเข้าใกล้ 1 หรือเท่ากับ 1 และค่าความผิดพลาดมาตรฐาน (RMSECV) ของความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมีกับค่าที่ได้จากการทำนายด้วย NIRS (calibration) ที่มีค่าน้อย บ่งชี้ว่าสมการทำนายค่า (Calibration) ที่สร้างขึ้นสามารถนำมาใช้ในการอธิบายค่าทำนายที่เกิดจากอิทธิพลของตัวแปรอิสระ (X) กับค่าแปรตาม (Y) ที่มีความสัมพันธ์กันมาก (William, 2007)

การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Lean et al. (2012) ในการใช้เทคนิค NIRS เพื่อทำนายค่ากรดไขมันที่ระเหยได้ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักโคนม ซึ่งเทคนิค NIRS ให้ค่า R เท่ากับ 0.73 มีความเหมาะสมในการใช้ทำนายค่ากรดไขมันที่ระเหยได้ในโคที่เกิดภาวะกระเพาะหมักเป็นกรด Jacobi et al. (2009) และ Stockl and Lichti (2018) ศึกษาการใช้เทคนิค NIRS ในการสร้างสมการทำนายปริมาณการสร้างกรดไขมันที่ระเหยได้ในหลอดทดลอง ซึ่งพบว่าให้ค่า R ที่เท่ากันคือเท่ากับ 0.94 และมีค่าคลาดเคลื่อน 4.0 อย่างไรก็ตาม Ward et al. (2011) พบว่า การใช้เทคนิคอิน NIRS มีความเหมาะสมในการใช้เป็นเครื่องมือสร้างสมการทำนายปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ในหลอดทดลองแต่จากปัจจัยด้านจำนวนข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ยังไม่มากพอเนื่องจากเป็นการศึกษานำร่อง (pilot scale) ทำให้ยังมีค่าความคลาดเคลื่อนสูงเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้ยังพบว่ามีการศึกษาการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจวิเคราะห์และทำนายความเข้มข้นของสารชีวเคมีในเลือดเพื่อเป็นเครื่องมือในการตรวจคัดกรองโรคทางเมแทบอลิก (metabolic disease) ในโคนม เช่น การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต (BHB) และ สารอะซีโตน (acetone) ในซีรั่มโคนมด้วยเทคนิค NIRS เป็นต้น (De Roos et al., 2007, .Sukhontarad and Yawongsa, 2020)

จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า การใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ทั้งหมด (Total VFA) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH value) จากตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักโคนม มีความน่าเชื่อถือในระดับปานกลาง ซึ่งถือว่าเป็นเครื่องมือที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยได้ โดยการศึกษาวิจัยต่อไปจะต้องทำความเข้าใจอย่างลึกซึ้งและต้องการการเก็บข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดความแม่นยำเทียบเท่ากับการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มความถูกต้องและแม่นยำของการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการทำนายค่าเคมีต่างๆ ในเลือดและค่าดัชนีการผลิตโคนมด้านต่างๆ และเพื่อสามารถพัฒนาเครื่อง NIRS แบบเคลื่อนที่หรือแบบพกพาในการตรวจวิเคราะห์หรือตรวจคัดกรองภาวะกระเพาะหมักเป็นกรดในโคนมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณาจารย์รวมทั้งเจ้าหน้าที่และนักศึกษาสาขาวิศวกรรมหลังการเก็บเกี่ยวและแปรสภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และสถาปัตยกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์และคำแนะนำในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างส่งตรวจด้วยเทคนิคเนียร์อินฟาเรดสเปคโตรสโกปี งานวิจัยนี้ได้รับทุนงบประมาณสนับสนุนจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2561

References

Corson D.C., Waghorn G.C., Ulyatt M.J. & Lee J. (1999). NIRS: Forage analysis and livestock feeding. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 61, 127–132.

Danscher AM, Li S, Andersen PH, Khafipour E, Kristensen NB, &Plaizier JC. (2015). Indicators of induced subacute ruminal acidosis (SARA) in Danish Holstein cows. *Acta Vet Scand*,17;57(1), 39.

De Roos A.P.W., van den Bijgaart H.J.C.M, Horlyk, J. & De Jong, (2007). Screening for subclinical ketosis in dairy cattle by Fourier transform infrared spectrometry. Journal of Dairy Science, 90, 1761-1766.

Duffield T, Plaizier J.C., Fairfield, A., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Wilson, J., Aramini, J. & McBride B. (2004).

Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 87(1), 59-66.

Fleming, A., Garrett, K., Froehlich, K., Beck, M., Bryant, R.H., Edwards, G. & Gregorini, P. (2020) Supplementation of spring pasture with harvested fodder beet bulb alters rumen fermentation and increases risk of subacute ruminal acidosis during early lactation. *Animals (Basel)*, 30:10(8), 1307.

Gäbel, G., Aschenbach, J. R., & Müller, F. (2002). Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. *Animal. Health Research Reviews*, 3(1), 15-30.

Inchaisri, C., Chanpongsang, S., Noordhuizen, J. & Hogeveen, H. (2013). The association of ruminal pH and some metabolic parameters with conception rate at first artificial insemination in Thai dairy cows. *Tropical Animal Health Production*, 45(5), 1183-1190.

Inchaisri, C., Chanpongsang, S., Noordhuizen, J. & Hogeveen, H. (2014). A cow-level association of ruminal pH on body condition score, serum beta-hydroxybutyrate and postpartum disorders in T hai dairy cattle. *Animal Science Journal*, 85(9), 861-867.

Jacobi, H.F., Moschner, C.R. & Hartung, E. (2009). Use of near infrared spectroscopy in monitoring of volatile fatty acids in anaerobic digestion. *Water Science and Technology,* 60(2), 339-46.

Jarassaeng, C., Aiumlamai, S., Wachirapakorn, C., Techakumphu, M., Noordhuizen, J. P., Beynen, A. C., & Suadsong, S. (2012). Risk factors of subclinical mastitis in small holder dairy cows in Khon Kaen province. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 42(2), 143-151.

Khafipour, E., Plaizier, J. C., Aikman, P. C., & Krause, D. O. (2011). Population structure of rumen *Escherichia coli* associated with subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 94(1), 351-360.

Kleen, J. L., Hooijer, G. A., Rehage, J. & Noordhuizen, J. P. T. M. (2003). Subacute ruminal acidosis (SARA): A review. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50(8), 406-414.

Kotarski, S.F., Thurn, K.K., Toure, A., Miller, F.R. & Waniska, R.D. (1992). *Grain sorghum digestion by ruminal microflora.* Texas Tech Sorghum Research Initiative.

Krause, K. M. & Oetzel, G. R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: *A review. Animal. Feed Science Technology*, 126(3-4), 215-236.

Lean I.J., Golder H.M., Black J.L., King R. & Rabiee A.R. (2013). *In vivo* indices for predicting acidosis risk of grains in cattle: Comparison with *in vitro* methods. *Journal of Animal Science*, 91(6), 2823-35.

Lee M.R.F, Fleming H.R., Cogan T, Hodgson C & Davies D.R. (2019). Assessing the ability of silage lactic acid bacteria to incorporate and transform inorganic selenium within laboratory scale silos. *Animal Feed Science Technology*, 253, 125-134.

Mathew A.G., Robbins C.M., Chattin S.E., & Quigley J.D. (1997). Influence of galactosyl lactose on energy and protein digestibility, enteric microflora, and performance of weanling pigs, *Journal of Animal Science*, 75(4), 1009–1016.

Mizuguchi, H., Kim, Y.H., Kanazawa, T., Ikuta, K. & Sato S. (2020). Effects of short-term fasting on ruminal pH and volatile fatty acids in cattle fed high-roughage versus high-concentrate diets. *Journal of Veterinay Medicinal Science*. 82(10), 1415-1420.

Mulligan, F.J. & Doherty, M.L. (2008). Production diseases of the transition cow. *The Veterinary Journal*, 176, 3–9.

Nagaraja T.G. & Titgemeyer E.C. (2007). Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *Journal of Dairy Science,* 90(Suppl 1), 17-38.

National Research Council. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (7th edition), National Academic. Press, Washington, DC.

Nocek, J. E. (1997). Bovine acidosis: Implications on laminitis. *Journal of Dairy Science*, 80(5), 1005-1028.

Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J. & Gill, D.R. (1998). Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 76, 275-286.

Pilachai, R., Schonewille, J. T., Thamrongyoswittayakul, C., Aiumlamai, S., Wachirapakorn, C., Everts, H. & Hendriks, W. H. (2012). Starch source in high concentrate rations does not affect rumen pH, histamine and lipopolysaccharide concentrations in dairy cows. *Livestock Science*, 150(1-3), 135-142.

Plaizier J.C., Krause D.O., Gozho G.N., McBride B.W. (2008). Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. Vet J. 176(1), 21–31.

Stermer, B.A., Bianchini, G.M. & Korth, K.L., (1994). Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *Journal of Lipid Research*. 35, 1133-1140.

Sukhontarad, P. & Yawongsa, A. (2020). The measurement of serum beta-hydroxybutyrate concentrations in dairy cows by near infrared spectroscopy. *Journal of Kasetsart Veterinary*, 30(2), 61-78.

Van Knegsel A.T.M., van der Drift S.G.A., Horneman M., de Roos A.P.W., Kemp B. & Graat E.A.M. (2010). Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93, 3065-3069.

Xue, F., Pan, X. & Jiang, L. (2018). GC–MS analysis of the ruminal metabolome response to thiamine supplementation during high grain feeding in dairy cows. *Metabolomics,* 14, 67.

Stefanska, B., Nowak, W., Komisarek, J., Taciak, M., Barszcz, M., Skomiał, J. (2017). Prevalence and consequence of subacute ruminal acidosis in Polish dairy herds. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition,* 101(4), 694-702.

Stockl A & Lichti F. (2018). Near-infrared spectroscopy (NIRS) for a real time monitoring of the biogas process. *Bioresource Technology*. 247, 1249-1252.

Ward A.J., Bruni E, Lykkegaard M.K., Feilberg A, Adamsen A.P., Jensen A.P. & Poulsen A.K. (2011). Real time monitoring of a biogas digester with gas chromatography, near-infrared spectroscopy, and membrane-inlet mass spectrometry. *Bioresource Technology*, 102(5), 4098-103.

Williams, P., Antoniszyn, J., Manley, M. (2019). *Near infrared technology: getting the best out of light. African Sun Media: Stellenbosch*, South Africa. http://scholar.sun.ac.za/bitstream/handle/10019.1/108695/williams_near_2019.pdf.

Research article

The measurement of total volatile fatty acid concentration and ph value in rumen fluid of rumen-fistulated dairy cow by near-infrared spectroscopy

Theerakul Nilnont[1*], Rittichai Pilachai[1], Kasama Chareekhot[2] and Saranya Workhwa[2]

[1]*Department of Veterinary Technology, Faculty of Technology, Udon Thani Rajabhat University, Mueang, Udon Thani, 41000, Thailand*
[2]*Department of Food Science and Technology, Faculty of Technology, Udon Thani Rajabhat University, Mueang, Udon Thani, 41000, Thailand*

ARTICLE INFO

Article history
Received: 24 May 2021
Revised: 29 May 2021
Accepted: 30 May 2021
Online published: 28 June 2021

Keyword
volatile fatty acid
pH
NIRS

ABSTRACT

pH value and volatile fatty acid (VFA) measurement in ruminal fluid samples are the standard markers to diagnose rumen acidosis in dairy cow. The previous studies showed that VFA measurement in various samples by using Near-infrared spectroscopy (NIRS) technique is a reliable to implement as analytical instrument. The objectives of this study were to assess the relationship between laboratory Total VFA concentration and pH value in ruminal fluid samples of dairy cow compared to Total VFA concentration and pH value in ruminal fluid samples of rumen-fistulated dairy cow by applied NIRS for generating the calibration equation. One-hundred and twenty-eight ruminal fluid samples from rumen-fistulated crossbred (Holstein Friesian×native) dairy cow with ruminal acidosis induced and were collected by every 2 hours after fed concentrate ration with seven times per day of 16 days period. All samples were analyzed for Total VFA concentration and pH value by using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and portable pH meter, respectively. NIRS was used for analyzed and generated calibration equation. The results demonstrated that the mean concentration of Total VFA and pH were 105.82±39.74 mM/L and 5.4±0.44, respectively. The statistical analysis to predict Total VFA concentration and pH value demonstrated the coefficient (R) value were 0.93 and 0.85, respectively. The application of NIRS to analyze Total VFA concentration and pH value in this study reveal the moderate reliable for study and research scale, thus more data collections are required for higher accuracy of the analysis.

*Corresponding author
E-mail address: theerakul_nil@yahoo.com (T. Nilnont)
Online print: 28 June 2021. Copyright © 2021. This is an open access article, production and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. https://doi.org/10.14456/paj.2021.8